На правах рукописи

ОВЧЕРЕНКО Сергей Сергеевич

ДИНАМИКА ПРОНИКНОВЕНИЯ БЕЛКА RL2 В КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА И ОТКРЫТИЯ-ЗАКРЫТИЯ ПАР ОСНОВАНИЙ ДНК, СОДЕРЖАЩИХ 8-ОКСОГУАНИН, ПО ДАННЫМ МЕТОДОВ МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

1.3.17 — Химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества

ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

диссертации на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

Новосибирск - 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН)

Научный руководитель:	Шернюков Андрей Владимирович кандидат химических наук, старший научный сотрудник Лаборатории магнитной радио- спектроскопии НИОХ СО РАН
Официальные оппоненты:	Уваров Михаил Николаевич кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Лаборатории химии и физики свободных радикалов, ФГБУН Институт химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского СО РАН
	Усачев Константин Сергеевич доктор физико-математических наук, профес- сор, заведующий Лабораторией структурного анализа биомакромолекул, ФГБУН Феде- ральный исследовательский центр "Казан-

ФГБУН Институт «Международный томо-Ведущая организация: графический центр» СО РАН

ский научный центр РАН "

Защита состоится 16 октября 2024 г. в 15:00 на заседании диссертационного совета 24.1.150.01 на базе ИХКГ СО РАН по адресу: 630090, г. Новосибирск, Институтская, 3, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИХКГ СО РАН и на сайте http://kinetics.nsc.ru. Текст автореферата размещен на сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации по адресу: http://vak.minobrnauki.gov.ru.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 630090, г. Новосибирск, Институтская, З, ИХКГ СО РАН, ученому секлиссертационного совета 24.1.150.01; e-mail: ретарю ref dissovet@kinetics.nsc.ru.

Автореферат разослан «__» ____ 2024 г.

Учёный секретарь диссертационного совета, кандидат химических наук

Подриения И. П. Поздняков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Intrinsically disordered proteins (IDP) - белки с внутренней (или естественной) неупорядоченностью (далее «внутренне неупорядоченные белки») составляют важный класс белков эукариот, которые участвуют в передаче сигналов и регуляции и напрямую связаны с развитием диабета, онкологических и нейродегенеративных заболеваний. В IDP отсутствует стабильная вторичная и третичная структура, однако различные участки IDP могут иметь разную степень разупорядоченности. Предполагается, что более упорядоченные участки IDP формируют начальные контакты связывания с молекулами-мишенями, облегчая последующее связывание остальных более гибких участков IDP. Наиболее информативным методом изучения внутрение неупорядоченных белков является ЯМР, поскольку он позволяет на уровне индивидуальных остатков аминокислот измерить динамику основной цепи белка и выявить более упорядоченные участки IDP. При введении в белок парамагнитной спиновой метки можно применить подход ЯМР, позволяющий выявить участки IDP с остаточной третичной структурой.

RL2 – рекомбинантный аналог фрагмента человеческого к-казеина - белка человеческого молока. Казеины из числа первых белков, признанных функциональными, но неупорядоченными и, поэтому, RL2, как часть к-казеина, можно отнести к IDP. Ранее было установлено, что RL2 может проникать как в опухолевые, так и в нормальные клетки человека, и вызывать гибель опухолевых клеток. Успешно завершены доклинические испытания препарата Лактаптин, действующим веществом которого является белок RL2. Было установлено, что одной из мишеней RL2 является белок внешней мембраны митохондрии ТОМ70, при связывании RL2 с которым подавляется выработка АТФ и индуцируется гибель опухолевых клеток. Неизученным остается вопрос о том, какие участки RL2 важны для связывания RL2 с молекулами-мишенями. Также не до конца ясны детали механизма проникновения RL2 в клетки человека. Ответы на эти вопросы могут указать на путь возможного улучшения терапевтических свойств RL2 или помочь при разработке лекарств на основе белка RL2. В диссертационной работе с применением методов ЯМР и ЭПР были изучены особенности структуры и организации RL2 в растворе и поведение RL2 в живых опухолевых клетках человека в процессе проникновения RL2.

Одним из наиболее распространенных окислительных повреждений ДНК является 8-оксо-7,8-дигидрогуанин (8-оксогуанин, охоG), наличие которого приводит к дестабилизации ДНК и к появлению мутаций:

пара гуанин – цитозин (G:C) заменяется на пару тимин – аденин (T:A). Обильное количество таких мутаций может привести к развитию рака. Напротив аденина в последовательности ДНК 8-оксогуанин формирует неправильную пару охоG:А. Клетки обладают ферментами репарации, которые распознают охоG и удаляют его из пар охоG:C (ферменты OGG1 и FPG), либо удаляют А из пар охоG:А (ферменты MutY и MUTYH). Не ясным остается вопрос о наличии общего механизма распознавания охоG на ранних этапах этими гликозилазами ДНК. Обычно для гликозилаз ДНК предполагают два механизма раннего распознавания повреждений: 1) активный – фермент способствует разрыву водородных связей в паре оснований и выворачиванию поврежденного основания из спирали ДНК для его захвата, 2) пассивный – фермент захватывает поврежденное основание в спонтанно открытой паре, когда поврежденное основание на короткое время оказывается вне спирали ДНК. Предполагается, что процесс спонтанного открытия-закрытия пар оснований ДНК может определять тип механизма раннего распознавания повреждений: пассивный механизм может быть обусловлен большей склонностью поврежденного основания по сравнению с неповрежденным находиться вне спирали ДНК. Несмотря на важность динамики процесса открытия-закрытия пар оснований для ответа на вопрос о наличии общего механизма раннего распознавания охоG структурно отличающимися вышеописанными гликозилазами ДНК, текущая экспериментальная информация по динамике пар с охоG ограничена: существуют работы по изучению динамики открытия – закрытия пары охоG:С [1, 2], но ни динамика открытия-закрытия пар охоG:А, ни влияние контекста нуклеотидной последовательности ДНК на динамику пар с охоG ранее не исследовались. В диссертационной работе методом ЯМР была изучена динамика открытия-закрытия пар охоG:С и охоG:А, а также пар G:С и G:А в разных нуклеотидных последовательностях дуплексов ДНК.

В диссертационной работе исследованы два класса объектов, имеющих отношение к проблеме онкологических заболеваний: белок RL2 – основной компонент противоопухолевого препарата Лактаптин и мутагенное повреждение ДНК, 8-оксогуанин, наличие которого может привести к развитию рака при неправильном осуществлении репарации ДНК. При этом результаты исследованных в диссертационной работе динамических процессов: динамика основной цепи RL2, динамика проникновения RL2 в клетки человека, динамика открытия – закрытия пар оснований ДНК, содержащих 8-оксогуанин – являются важными для понимания противоопухолевых свойств белка RL2 и для понимания раннего распознавания 8-оксогуанина в репарации ДНК.

Степень разработанности темы исследования

Казеины образуют аморфные агрегаты – казеиновые мицеллы и, поскольку RL2 является большим фрагментом к-казеина, RL2 должен обладать склонностью к формированию агрегатов в растворе. В первичной последовательности RL2 имеется единственный остаток цистеина, из-за чего появляется возможность формирования ковалентных димеров белка. Было показано, что RL2 в растворе представляет собой смесь мономера, ковалентного димера и высокомолекулярных агрегатов. [3] Ввиду быстрой спиновой релаксации ядер агрегаты белков не наблюдаются в спектрах ЯМР, что подразумевает поиск условий, при которых большая часть RL2 не находится в агрегированном состоянии. Наличие в растворе сразу двух форм RL2 – димера и мономера – усложняет проводимые исследования необходимостью соотнесения наблюдаемых сигналов в спектрах ЯМР с соответствующими формами RL2.

Для отслеживания методом ЭПР поведения RL2 в живых клетках человека спиновые метки, вводимые в белок, должны иметь резистентность к биовосстановителям, присутствующим в клетках. Примененная в диссертационной работе спиновая метка на основе стерически экранированного нитроксильного радикала, обладающая высокой резистентностью к восстановлению аскорбатом [4], ранее ни разу не тестировалась в экспериментах ЭПР внутри клеток. Проведенные в работе исследования ЭПР по проникновению конъюгата RL2 со спиновой меткой в клетки человека могут обеспечить хороший задел для последующего применения этой спиновой метки в экспериментах ЭПР на спин-меченных биомолекулах в живых клетках человека.

Получить константы скоростей и равновесия процесса открытия – закрытия пар оснований ДНК позволяет методика катализируемого протонного обмена [5]. Поскольку обмен иминопротона с протонами воды протекает через открытое состояние пары, когда водородные связи разрушены, и основание с иминопротоном вывернуто из спирали ДНК более чем на 30° [6], управление процессом обмена путем добавления внешнего акцептора протонов позволяет при благоприятных условиях извлечь константы скоростей и равновесия открытия – закрытия пар. Значения эффективной константы скорости обмена иминопротонов дуплексов ДНК с протонами воды $k_{\rm ex}$ попадают в диапазон чувствительности методики ЯМР переноса намагниченности с протонов воды и могут успешно быть измерены. Среди подходов переноса намагниченности с воды в подходе CLEANEX-PM [7] предусмотрена компенсация влияния внутримолекулярной кросс-релаксации и спиновой диффузии, что позволяет извлекать более точные значения $k_{\rm ex}$. В исходной имплементации CLEANEX-PM был

разработан для изучения обмена в белковых молекулах. Частотный диапазон применимости CLEANEX-PM определяется мощностью (gB₁) импульса спин-лока, продолжительность которого в экспериментах достигает 100 мс и больше. В спектрах ЯМР дуплексов ДНК сигналы иминопротонов могут находиться на расстоянии большем, чем 10 м.д. от сигнала протонов воды, что для постоянных магнитных полей B₀ > 500 МГц приводит к необходимости увеличения мощности импульса спин-лока выше допустимых значений, безопасных для приборов ЯМР. Таким образом, для измерения $k_{\rm ex}$ иминопротонов ДНК требовалась адаптация подхода CLEANEX-PM, которая успешно была реализована в диссертационной работе.

Цели и задачи исследования

Целью диссертационной работы является изучение процессов, протекающих с белком RL2 при его нахождении в растворе и в живых клетках человека, а также определение параметров динамики процесса открытия-закрытия пар оснований ДНК, содержащих повреждение 8оксогуанин.

Для достижения целей работы были поставлены следующие задачи:

• Определить динамику основной цепи RL2 и выявить более упорядоченные участки основной цепи белка с помощью ¹⁵N релаксационных экспериментов ЯМР. Получить данные об остаточной структуре RL2 в растворе с помощью метода парамагнитного усиления релаксации. Соотнести получаемые результаты ЯМР с соответствующими формами RL2 – димером и мономером.

• Разработать методику проведения экспериментов ЭПР на живых клетках человека и исследовать поведение белка RL2 в клетках аденокарциномы легких человека A549 в процессе его проникновения.

• Адаптировать подход CLEANEX-PM для измерения констант скорости обмена $k_{\rm ex}$ иминопротонов с протонами воды. Применить полученный протокол CLEANEX-PM и при разных концентрациях добавляемого внешнего акцептора протонов измерить значения $k_{\rm ex}$ иминопротонов для набора дуплексов ДНК, содержащих пары оснований G:A, G:C, охоG:A и охоG:C. Обработать полученные данные, применяя формализм катализируемого протонного обмена, и получить кинетические параметры процесса открытия-закрытия исследуемых пар оснований.

• Получить кривые плавления исследуемых дуплексов ДНК, извлечь термодинамические параметры плавления и установить влияние наличия пар с 8-оксогуанином на стабильность дуплексов ДНК.

Научная новизна работы

Показано, что N-концевой участок RL2 является наиболее упорядоченным в белке и вовлечен в формирование остаточной третичной структуры RL2. Установлено, что RL2 проникает в клетки человека, преимущественно находясь в агрегатах, которые внутри клеток распадаются на отдельные белковые молекулы. Установлено, что клетки аденокарциномы легких человека A549 способны накапливать в себе RL2.

Показана применимость спиновой метки на основе нитроксильного радикала с тетраэтильными заместителями для проведения экспериментов ЭПР в живых клетках человека на спин-меченных биомолекулах при их микромолярных концентрациях.

Создан протокол с адаптацией CLEANEX-PM, позволяющий измерять константы скорости обмена иминопротонов с протонами воды k_{ex} , который включает в себя 1) применение блока спин-лока на частоте, расположенной в центре диапазона между резонансами иминопротонов и резонансом протонов воды; 2) учет компенсации неравного нагрева образца за счет разной длительности блока спин-лока; 3) учет зависимости стационарной намагниченности протонов воды от длительности применяемого спин-лока, которая позволяет избежать искажений в измеряемые значения k_{ex} и повысить точность получаемых величин k_{ex} .

Получены кинетические константы скоростей открытия и закрытия пары охоG:А и изучен вопрос о влиянии нуклеотидной последовательности ДНК на динамику открытия – закрытия пар 8-оксогуанина с аденином и цитозином. Установлено, что 8-оксогуанин в паре напротив аденина оказывается более доступным вне спирали ДНК, чем в паре с цитозином, тогда как 8-оксогуанин в паре с цитозином даже менее доступен вне спирали ДНК, чем гуанин в паре с цитозином.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты диссертационной работы по установлению особенностей структуры и организации белка RL2 в растворе и по исследованию процесса проникновения белка RL2 в клетки человека могут стать основой для дальнейшего улучшения противоопухолевых свойств RL2, а также могут быть полезными при разработке новых лекарственных препаратов на основе белка RL2.

Разработанная методика проведения длительных экспериментов ЭПР в живых клетках человека при физиологических значениях температуры с применением спиновой метки на основе нитроксильного радикала со стерически экранированным радикальным центром может успешно использоваться научным сообществом при изучении свойств биополимеров непосредственно в живых клетках. Разработанный протокол ЯМР с адаптацией CLEANEX-PM может быть полезен широкому кругу исследователей, занимающихся изучением процессов в биомолекулах, связанных с обменом лабильных протонов с протонами воды.

Методология и методы исследования

Для исследования структуры и организации RL2 в растворе применялись методы стационарного ЭПР, двойного электрон-электронного резонанса (DEER), проводились двумерные и трехмерные импульсные эксперименты ЯМР тройного резонанса ¹H, ¹³C и ¹⁵N, а также применялся метод парамагнитного усиления релаксации (PRE). Для исследования поведения белка RL2 в клетках человека проводились эксперименты стационарного ЭПР и конфокальной микроскопии. Для исследования динамики открытия – закрытия пар оснований применялась методология катализируемого протонного обмена, проводились измерения констант скорости обмена иминопротонов с протонами воды, применяя разработанный протокол ЯМР с адаптацией CLEANEX-PM. Для определения термодинамических параметров плавления дуплексов ДНК и отнесения сигналов ¹H иминопротонов проводились одномерные и двумерны эксперименты ЯМР ¹H.

Положения, выносимые на защиту

1) В растворе RL2 образует водорастворимые агрегаты («казеиновые мицеллы»), нерегистрируемые в ЯМР, количество которых зависит от кислотности среды. Однако введение в RL2 спиновых меток позволяет зарегистрировать агрегаты RL2 методом ЭПР. Регистрируемой в ЯМР формой RL2 является мономер.

2) По данным многомерной спектроскопии ЯМР RL2 является внутренне неупорядоченным белком. Мономерная форма белка включает N-концевой участок (1-43 а.о.), который по данным ¹⁵N релаксационных экспериментов ЯМР является наиболее упорядоченным. В участке на N-конце (1–63 а.о.) наблюдается остаточная третичная структура.

3) Димеры RL2 образуют агрегаты в культуральной среде, которые, проникая в живые опухолевые клетки аденокарциномы легких человека A549, распадаются на отдельные белковые молекулы.

4) Спиновая метка на основе нитроксильного радикала с тетраэтильными заместителями является эффективным зондом для проведения экспериментов ЭПР в течение более 10 часов в живых клетках человека при физиологических температурах на биомолекулах при их микромолярных концентрациях.

5) Адаптация CLEANEX-PM позволяет измерять константы скорости обмена иминопротонов ДНК с протонами воды. Основание 8-

оксогуанин на 3–4 порядка более доступно в своем внеспиральном положении в ДНК, будучи в паре с аденином по сравнению с парой с цитозином. При этом в паре с цитозином доступность 8-оксогуанина меньше доступности гуанина. Дестабилизация дуплекса ДНК с парой 8-оксогуанин – цитозин происходит за счет дестабилизации соседних с ней пар оснований.

Личный вклад автора

Автор участвовал в постановке задач, разработке плана исследований, обсуждении результатов и подготовке текста публикаций по теме диссертации. Весь экспериментальный материал по ЭПР и ЯМР спектроскопии был получен и обработан непосредственно автором или непосредственно с его участием. Протокол с адаптацией CLEANEX-PM был разработан автором совместно с научным руководителем.

Апробация работы

Результаты и выводы диссертационной работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на международных научных конференциях: Modern development of magnetic resonance (MDMR 2022, MDMR 2020), Magnetic Resonance - Current State and Future Perspectives – (EPR-75), Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes (VVV-2022), EUROMAR 2021 on-line, ISMAR 2021 on-line, EUROISMAR 2019, Magnetic Resonance and Magnetic Phenomena in Chemical and Biological Physics 2018, Spin physics, spin chemistry and spin technology (SPCT-2018), Spinus 2018; на всероссийских научных конференциях: современные проблемы органической химии (СПОХ-2023), симпозиум «Современная химическая физика» 2021, а также на научной конференции молодых ученых OpenBio-2023.

Степень достоверности результатов исследований

Достоверность результатов и выводов диссертационной работы обеспечена применением современного экспериментального оборудования и специализированных программ обработки экспериментальных данных, активно используемых мировым научным сообществом. Все полученные результаты и выводы многократно проверялись авторами на отсутствие противоречий и на согласованность с известными литературными данными, а также проходили проверку рецензентами при публикации материалов диссертационной работы в известных цитируемых научных журналах.

Соответствие специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества

Диссертационная работа соответствует п. 1 «химическая и спиновая динамика элементарных процессов, экспериментальные методы исследования химической структуры и динамики химических превращений», п. 5 «химические механизмы реакций и управление реакционной способностью, спиновая динамика и спиновая химия, экспериментальные методы исследования химической, энергетической и спиновой динамики» паспорта специальности 1.3.17 для физико-математической отрасли науки.

Объем и структура работы

Диссертационная работа состоит из оглавления, введения, трех глав, результатов и выводов, списка сокращений аббревиатур и терминов, списка используемой литературы и приложения. Полный объем диссертационной работы составляет 140 страниц с 54 рисунками и 7 таблицами. Список литературы включает 203 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении описываются актуальность и степень разработанности темы исследования, формулируются цели и задачи исследования, описываются научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, формулируются положения, выносимые на защиту, приводятся сведения о личном вкладе автора, апробации работы и степени достоверности результатов исследований.

Первая глава посвящена литературному обзору. В *разделе 1.1* описывается история обнаружения внутренне неупорядоченных белков, современный взгляд на их свойства и вовлеченность их в биологические процессы, описываются свойства и функции подкласса внутренне неупорядоченных белков – казеинов, приводится информация об объекте исследований – белке RL2. В *разделе 1.2* описываются методы изучения внутренне неупорядоченных белков на основе спектроскопий ЯМР и ЭПР. В *разделе 1.3* описываются структура и свойства повреждения ДНК, 8-оксогуанин, а также приводится информация о ферментах репарации ДНК, распознающих 8-оксогуанин, и о механизмах распознавания повреждений на ранних этапах. В *разделе 1.4* описывается методология катализируемого протонного обмена, а также режимы обмена, позволяющие извлечь значения констант скоростей и равновесия процесса открытия-закрытия пар оснований ДНК. В *разделе 1.5* обобщается основная информация об объектия и методах исследования.

Вторая глава посвящена изучению особенностей структуры и организации RL2 в растворе по данным методов магнитного резонанса, а также изучению поведения RL2 в клетках аденокарциномы легких человека A549 в процессе его проникновения по данным ЭПР и конфокальной микроскопии.

Методом ЭПР была изучена склонность мономера RL2 в растворе формировать агрегаты при 1) кислом и 2) нейтральном значении pH (Рисунок 1). Показано, что при переходе с pH=3.9 до pH=7.5 (с добавлением 150 мМ NaCl) большинство молекул конъюгата RL2 со спиновой меткой MTSL (RL2-MTSL) переходят в агрегаты, о чем свидетельствует уширение спектров ЭПР (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Спектры ЭПР (черным) водных растворов RL2-MTSL при pH=3.9 (А, Б) и pH=7.5, 150 мМ NaCl (В, Г) и их моделирования (красным). Малоинтенсивная спектральная компонента в (А), относящаяся к неотмытой метке MTSL, не связанной с RL2, полностью воспроизводится в спектре (В).

С целью выявления более упорядоченных участков основной цепи RL2 в растворе были измерены релаксационные параметры T_1 , T_2 ядер ¹⁵N и ¹H–¹⁵N NOE амидных групп NH основной цепи белка (Рисунок 2). Из рисунка 2 видно, что наличие метки MTSL в положении Cys8 в RL2 приводит к минимальным искажениям динамики основной цепи RL2, о чем свидетельствуют почти идентично воспроизводящиеся значения ¹⁵N T_1 , T_2 и ¹H–¹⁵N NOE для RL2 и диамагнитного RL2-MTSL. Участок RL2 на N-конце, 1–43 а.о., является наиболее упорядоченным по сравнению с остальной частью белка, о чем свидетельствуют положительные значения ¹H–¹⁵N NOE, а также минимальные значения времени ¹⁵N T_2 (Рисунок 2). Чтобы определить, присутствует ли в области более упорядоченного участка RL2 (1–43 а.о.) какая-либо остаточная третичная структура белка был применен подход «измерения по единственной временной точке» ме-

тодики PRE. Отношения высот пиков I_{пара} / I_{дна} индивидуальных NH групп основной цепи RL2, полученные из спектров ЯМР ¹H–¹⁵N HSQC парамагнитного и диамагнитного образцов [U-¹⁵N]-RL2-MTSL свидетельствуют о наличии в белке контактов дальнего порядка в пределах N-концевого участка 1–63 а.о. RL2 и отсутствие таковых между N-концевой областью, включающей в себя ~10–15 а.о. с каждой стороны от остатка Cys8, в который введена метка MTSL, и C-концевой частью 64–121 а.о. RL2 (Рисунок 3).



Рисунок 2 – Сводная диаграмма значений ¹⁵N T₁, T₂, и ¹H–¹⁵N NOE основной цепи RL2 для образцов, однородно обогащенных изотопом ¹⁵N, [U-¹⁵N]-RL2 (водный раствор, pH~3.5, синие столбики) и диамагнитного конъюгата [U-¹⁵N]-RL2 со спиновой меткой MTSL (ацетатный буфер, pH = 3.9, оранжевые столбики).



Рисунок 3 – Диаграмма отношений высот кросс-пиков $I_{пара}/I_{диа}$, полученных из спектров ${}^{1}H{-}^{15}N$ HSQC парамагнитного ($I_{пара}$) и диамагнитного ($I_{пара}$) образцов [U-15N]-RL2-MTSL. Звездочкой указано положение остатка Cys8, в который введена метка MTSL.

Для изучения методом ЭПР поведения RL2 в клетках аденокарциномы легких человека A549 в качестве объекта исследования был выбран димер RL2 (RL2₂) (Рисунок 4), в положения остатков лизина которого вводилась спиновая метка 1 (Рисунок 5), sRL2. На рисунке 6 представлены полученные спектры стационарного ЭПР образца sRL2 и радикала 2 (Рисунок 5) в воде.



Рисунок 4 – Схематическое изображение димеров RL2. Буквами обозначены аминокислотные остатки лизина (К) и цистеина (С), а цифрами – их положения в последовательности RL2.



Рисунок 5 – А) Структурные формулы спиновой метки 1 и нитроксильного радикала 2. Б) Схема мечения боковой цепи остатка лизина спиновой меткой 1.



и их моделирования (красным).

RL2 склонен образовывать в растворе агрегаты и необходимо было ответить на вопрос, могут ли компоненты культуральной среды DMEM для инкубирования клеток спровоцировать агрегацию RL2 прямо перед его проникновением в клетки человека. Характер изменения с течением времени формы спектра ЭПР sRL2 при его добавлении в DMEM показал уменьшение интенсивности спектральной компоненты, относящейся к отдельным молекулам sRL2 в растворе, и увеличение интенсивности компоненты с более длительным временем корреляции вращений спиновой метки (Рисунок 7), что явно указывает на образование агрегатов sRL2 в среде DMEM.



Рисунок 7 – А) Спектры ЭПР образца sRL2 (среднее отношение 1 к RL2₂ равно 2.4) в DMEM при pH = 6.0, полученные в разные моменты времени с момента 5-кратного разбавления водного раствора sRL2 средой DMEM. Б) Соответствующая А) кинетика спада второго интеграла в единицах спиновой концентрации.

Для отслеживания поведения RL2 в клетках человека A549 были проведены эксперименты, в которых клетки А549 в течение часа инкубировали в среде DMEM, содержащей 5.5 мкМ или 0.5 мкМ sRL2 (среднее отношение 1 к RL2₂ равно 4, концентрация спинов – 24 мкМ и 2 мкМ, соответственно), после чего их промывали и 4 мкл суспензии клеток помещали в капилляр для исследований. На рисунке 8 приведены спектры ЭПР этих двух образцов клеток А549 в разные промежутки времени после инкубации A549 с sRL2. Концентрация спинов в клетках A549 составила 730 мкМ и 60 мкМ, что для обоих случаев соответствует ~30 кратному увеличению концентрации спинов внутри клеток по сравнению со средой DMEM и указывает на то, что клетки А549 способны накапливать в себе sRL2. Как видно (Рисунок 8), форма спектров ЭПР с течением времени существенно меняется. Удалось получить хорошее согласие расчетных и экспериментальных спектров ЭПР, предполагая наличие трех спектральных компонент, которые относятся к (1) агрегатам sRL2, (2) отдельным белковым молекулам sRL2 и (3) коротким спин-меченным пептидам или аминокислотам, возникающим в результате белковой деградации (Рисунок 9).



 322
 324
 326
 328
 330
 332
 334
 336
 322
 324
 326
 328
 330
 332
 334
 336

 Магнитное поле, мТл
 Магнитное поле, мТл
 Магнитное поле, мТл
 Магнитное поле, мТл

Рисунок 8 – Спектры ЭПР образцов клеток А549 после их инкубации в DMEM с 5.5 мкМ (А) или 0.5 мкМ (Б) sRL2 (среднее отношение 1 к RL2₂ равно 4), зарегистрированные в разные промежутки времени после инкубации клеток.



Рисунок 9 – А) Спектральные компоненты (1-3) расчетных спектров ЭПР. (Б) – Наложение экспериментальных (черным) и расчетных (красным) спектров ЭПР образцов клеток А549 после их инкубации с 5.5 мкМ (I) или 0.5 мкМ (II) sRL2. Спектры (I) и (II) получены в моменты времени 2.16 часов и 0.96 часов, соответственно, с момента окончания инкубации кле-

ток с sRL2.

Далее было изучено влияние ингибитора эндоцитоза, азида натрия (NaN₃), на эффективность проникновения sRL2 в A549. Клетки A549 в течение часа инкубировали с 1.34 мкМ sRL2 (среднее отношение 1 к RL2₂ равно 3.5) в присутствии и отсутствии 1% NaN₃, после чего их промывали и 4 мкл суспензии клеток, смешанные с 4 мкл раствора PBS (pH=7.4), помещали в капилляр для исследований. Форма спектров ЭПР образцов A549 менялась аналогичным образом, как это было обнаружено для двух более ранних экспериментов (Рисунок 8). Также удалось добиться хорошего согласия расчетных и экспериментальных спектров ЭПР (Рисунок 10), используя спектральные компоненты, представленные на рисунке 9. Обнаружено, что добавление азида натрия в DMEM при инкубации клеток приводит к ~5 кратному уменьшению концентрации sRL2 в клетках A549, что указывает на то, что основным механизмом проникновения RL2 в клетки A549 является эндоцитоз, при этом блокирование эндоцитоза не приводит к полной потере способности RL2 проникать в человеческие клетки.



Рисунок 10 – Экспериментальные спектры ЭПР (черным) образцов клеток А549 после их инкубации с 1.34 мкМ sRL2 (среднее отношение 1 к RL2₂ равно 3.5) без добавления (А) и с добавлением (А, Б) 1% NaN₃ и их моделирования (красным и синим). Экспериментальные спектры получены в момент времени ~1 час с момента окончания инкубации клеток с sRL2.

На рисунке 11 представлены временные зависимости интегральной интенсивности спектров ЭПР упомянутых выше четырех образцов клеток A549 после их инкубации с sRL2, а также интенсивностей отдельных спектральных компонент (1-3). Как видно (Рисунок 11), агрегаты RL2, попадая в клетки человека, разрушаются частично до состояния отдельных белковых молекул RL2, а также до состояния коротких пептидов.



Рисунок 11 – Кинетика спада интегральной интенсивности спектров ЭПР и отдельных компонент (1-3) для образцов А549 после их инкубации с (А) 5.5 мкМ и (Б) 0.5 мкМ sRL2 (среднее отношение 1 к RL2₂ равно 4), (В, Г) 1.34 мкM sRL2 (среднее отношение 1 к RL2₂ равно 3.5) без добавления (В) и с добавлением (Г) 1% NaN₃.

Третья глава посвящена определению параметров констант скоростей и равновесия процесса открытия—закрытия пар оснований ДНК, содержащих повреждение 8-оксогуанин.

Для определения констант скоростей открытия k_{op} , закрытия k'_{cl} и равновесия K'_{eq} процесса открытия–закрытия пар оснований G:A, G:C, охоG:A и охоG:C, в которых G или охоG помещен в состояние наихудшей C[G/0x0G]T или наилучшей укладки A[G/0x0G]G с соседними парами оснований, были измерены эффективные константы скорости обмена иминопротонов ДНК с протонами воды, k_{ex} , при варьируемой концентрации протонного акцептора, 2,2-дифторэтиламина (ДФЭА) (Рисунок 12). Из аппроксимации этих зависимостей моделью двухстадийного обмена в рамках формализма катализируемого протонного обмена были получены значения k_{op} , k'_{cl} и K'_{eq} (Таблица 1).



Рисунок 12 – Зависимости эффективной константы скорости обмена k_{ex} от концентрации осно́вной формы ДФЭА для иминопротонов G₈ и охоG₈ в дуплексах ДНК 1 (А), 2 (Б), 4 (В), 5 (Г), 6 (Д) и 8 (Е) (Нумерация дуплексов соответствует той, которая в таблице 1).

Таблица 1 – Результаты констант скоростей открытия k_{op} , закрытия k'_{cl} и равновесия K'_{eq} процесса открытия – закрытия пар, содержащих основания G_8 и охо G_8 , в исследуемых дуплексах ДНК.

	Дуплексы ^{<i>a</i>}	$k_{\rm op},{\rm c}^{-1}$	$k'_{\rm cl}, \times 10^{-4}, {\rm c}^{-1}$	$K'_{\rm eq}, \times 10^6$
1	5'-GGTACGC <u>G</u> TACC-3' 3'-CCAT <u>G</u> CGCATGG-5'	EX2 ^b	EX2	0.158 ± 0.003

2	5'-GGTACGC <u>X</u> TACC-3' 3'-CCAT <u>X</u> CGCATGG-5'	EX2	EX2	0.141 ± 0.003
3	5'-GGTAAGC <u>G</u> TACC-3' 3'-CCAT <u>G</u> CGAATGG-5'	n/d ^c	n/d	n/d
4	5'-GGTAAGC <u>X</u> TACC-3' 3'-CCAT <u>X</u> CGAATGG-5'	183 ± 17	32 ± 3	574 ± 18
5	5'-GGTCCTA <u>G</u> GACC-3' 3'-CCAG <u>G</u> ATCCTGG-5'	EX2	EX2	0.118 ± 0.009
6	5'-GGTCCTA <u>X</u> GACC-3' 3'-CCAG <u>X</u> ATCCTGG-5'	EX2	EX2	0.048 ± 0.003
7	5'-GGTCATA <u>G</u> GACC-3' 3'-CCAG <u>G</u> ATAATGG-5'	n/d	n/d	n/d
8	5'-GGTCATA <u>X</u> GACC-3' 3'-CCAG <u>X</u> ATAATGG-5'	76 ± 5	7.0 ± 0.8	1080 ± 89

^{*а*} <u>**Х**</u>, 8-оксогуанин.

^b EX2, константы скоростей k_{op} и k'_{cl} невозможно было извлечь поскольку константа скорости закрытия значительно превышала константу скорости обмена из открытого состояния пар оснований G₈ и охоG₈.

^c n/d, константы скоростей k_{op} , k'_{cl} и равновесия K'_{eq} невозможно было получить для иминопротонов G₈ в дуплексах **3** и **7**, поскольку эффективная константа скорости обмена превышала допустимый диапазон значений, получаемых данным методом.

Установлено, что пара охоG:С слегка более стабильна, чем пара G:С (K'_{eq} =0.141 для охоG:С против K'_{eq} =0.158 для G:С в дуплексах 1 и 2; K'_{eq} =0.048 для охоG:С против K'_{eq} =0.118 для G:С в дуплексах 5 и 6), в то время как равновесие K'_{eq} в паре охоG:А смещено на 3–4 порядка в сторону открытого состояния (K'_{eq} =574 для охоG:А против K'_{eq} =0.141 для охоG:С в дуплексах 2 и 4; K'_{eq} =1080 для охоG:А против K'_{eq} =0.048 в дуплексах 6 и 8). Таким образом, маловероятно, что охоG в паре с С подвергается захвату гликозилазы, будучи вывернутым из спирали ДНК, поскольку пара охоG:С открывается не легче, чем нормальная пара G:С. Когда охоG оказывается напротив А по сравнению с С, его доступность вне спирали ДНК повышается на 3–4 порядка, что может способствовать его внеспиральному распознаванию гликозилазами ДНК.

Чтобы установить влияние наличия пар с 8-оксогуанином на термическую стабильность дуплексов ДНК были получены температурные зависимости химических сдвигов метильной группы С5 тиминовых оснований (Рисунок 13), из аппроксимации которых в рамках модели "всё или ничего" были получены параметры температуры плавления дуплексов ДНК – $T_{\rm m}$ – температуры, при которой концентрация одиночных и двой-

ных цепей ДНК совпадают, а также термодинамических параметров процесса плавления ΔH , ΔG° и ΔS° (Таблица 2).



Рисунок 13 – Температурные зависимости химического сдвига метильных протонов тиминовых оснований для дуплексов ДНК с плохой укладкой C[G/oxoG]T (слева) и хорошей укладкой A[G/oxoG]G (справа) G₈/oxoG₈.

Дуплексы	T _m , K	∆ <i>H</i> , кДж∙моль ⁻¹	ΔG° ₂₉₈ , кДж·моль ⁻¹	ΔS° ₂₉₈ , кДж [.] моль ⁻¹ ·K ⁻¹
1	340.6 ± 0.2	466 ± 15	74 ± 2	1.32 ± 0.06
2	335.7 ± 0.4	491 ± 22	71 ± 3	1.41 ± 0.08
4	331.1 ± 0.3	478 ± 19	63 ± 2	1.39 ± 0.07
5	336.9 ± 0.4	556 ± 30	80 ± 4	1.60 ± 0.11
6	336.4 ± 0.3	575 ± 33	81 ± 4	1.66 ± 0.12
8	329.6 ± 0.4	565 ± 41	70 ± 4	1.66 ± 0.15

Таблица 2 – Термодинамические параметры плавления дуплексов ДНК

Показано (Таблица 2), что наличие пары охоG:С понижает стабильность дуплекса ДНК в контексте плохой укладки (дуплексы 1 и 2), тогда как в контексте хорошей укладки (дуплексы 5 и 6) наличие пары охоG:С не приводит к дестабилизации дуплекса ДНК. При этом наличие пары охоG:А приводит к наибольшей дестабилизации дуплексов и при хорошей и при плохой укладке $G_8/0xoG_8$.

Данные показывают (Таблицы 1 и 2), что дестабилизирующий эффект наличия пары охоG:С в дуплексе при условии плохой укладки C[G/oxoG]T нельзя объяснить тем, что пара открывается легче по сравнению с неповрежденной парой G:С. Однако равновесия остальных пар оснований, находящихся в центральной части дуплексов 1 и 2 (пары G₆:C₇ и T₉:A₄), являются более смещенными в сторону открытого состояния в дуплексе 2 по сравнению с дуплексом 1 (K'_{eq} (G₆:C₇)=0.11 в дуплексе 1, K'_{eq} (G₆:C₇)=0.24 в дуплексе 2; K'_{eq} (T₉:A₄)=35 в дуплексе 1, K'_{eq} (T₉:A₄)=58 в дуплексе 2), тогда как равновесия околоконцевых пар оснований (пары G₂:C₁₁ и T₃:A₁₀) являются схожими для обоих дуплексов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Изучение особенностей структуры и организации белка RL2, обладающего противоопухолевой активностью, в растворе с помощью методов магнитного резонанса позволило установить, что при физиологических значениях pH и ионной силы RL2 преимущественно находится в водорастворимых агрегатах, тогда как при кислых значениях pH RL2 преимущественно находится в виде отдельных белковых молекул.

2. Методами многомерной спектроскопии ЯМР показано, что RL2 является внутренне неупорядоченным белком. Установлено, что N-концевой участок белка (1-43 а.о.), который важен для проявления противоопухолевой активности RL2, является наиболее упорядоченным. В участке на N-конце (1–63 а.о.) наблюдается остаточная третичная структура RL2 по данным ЯМР парамагнитного усиления релаксации.

3. Продемонстрирована успешная применимость спиновой метки на основе нитроксильного радикала с тетраэтильными заместителями для проведения длительных экспериментов ЭПР в живых клетках человека на биомолекулах при их микромолярных концентрациях. Установлено, что основным путем проникновения RL2 в клетки человека является эндоцитоз, при котором белок преимущественно проникает в виде агрегатов, которые распадаются на отдельные молекулы внутри клеток.

4. Показано, что модифицированный в работе протокол ЯМР СLEANEX-PM позволяет измерять константы скорости обмена иминопротонов ДНК с протонами воды и может успешно применяться с использованием катализируемого протонного обмена для изучения динамики процесса открытия-закрытия пар оснований ДНК. На основании данных динамики открытия-закрытия пар показано, что основание 8-оксогуанин оказывается на 3–4 порядка более доступным в своем внеспиральном положении в ДНК, когда находится напротив аденина по сравнению с тем, когда 8-окогуанин напротив цитозина. При этом, будучи напротив цитозина, доступность 8-оксогуанина во внеспиральном положении в ДНК оказывается даже меньше доступности гуанина во внеспиральном положении, когда гуанин напротив цитозина.

5. Дестабилизирующий эффект наличия пары 8-оксогуанин – цитозин в дуплексах ДНК не происходит на уровне индивидуальной пары оснований, а является следствием изменения стабильности пар оснований соседних с парой 8-оксогуанин – цитозин. Показано, что наличие пары 8оксогуанин – цитозин в ДНК не всегда приводит к её дестабилизации.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Structural and aggregation features of a human κ -Casein fragment with antitumor and cell-penetrating properties / Chinak O.A., Shernyukov A.V., **Ovcherenko S.S.** et al. // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, Nº 16. – P. 2919.

2. Uptake of Cell-Penetrating Peptide RL2 by Human Lung Cancer Cells: Monitoring by Electron Paramagnetic Resonance and Confocal Laser Scanning Microscopy / **Ovcherenko S.S.**, Chinak O.A., Chechushkov A.V. et al. // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, № 18. – P. 5442.

3. Dynamics of 8-Oxoguanine in DNA: Decisive Effects of Base Pairing and Nucleotide Context / **Ovcherenko S.S.**, Shernyukov A.V., Nasonov D.M. et al. // *Journal of the American Chemical Society* – 2023. – Vol. 145, № 10. – P. 5613-5617.

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. S.S. Ovcherenko, A.V. Shernyukov, O.A. Chinak, A.S. Fomin, E.A. Sviridov, V.A. Richter, E.G. Bagryanskaya, The Dynamics of Lactaptin in solution by NMR // 15-th International School-Conference Spinus 2018. Magnetic resonance and its applications, Saint Petersburg, 2018.

2. С.С. Овчеренко, Динамика основной цепи пептида Лактаптина по данным 15N релаксационных измерений и НЕТNOE // 56-я международная научная студенческая конференция: материалы секции Физические методы в естественных науках, Новосибирск, 2018.

3. A.V. Shernyukov, S.S. Ovcherenko, O.A. Chinak, V.A. Richter, E.G. Bagryanskaya, The Dynamics of Lactaptin in solution by NMR and PRE // XXVIIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS 2018), Ireland, 2018.

4. S.S. Ovcherenko, A.V. Shernyukov, O.A. Chinak, V.A. Richter, E.G. Bagryanskaya, Studying lactaptin using NMR relaxation experiments and PRE // III International conference "Spin physics, spin chemistry and spin technology" (SPCT-2018), Novosibirsk, 2018.

5. S.S. Ovcherenko, Studying intrinsically disordered protein lactaptin by PRE // V International school for young scientists. Magnetic Resonance and Magnetic Phenomena in Chemical and Biological Physics, St. Petersburg region, 2018.

6. С.С. Овчеренко, Изучение динамики основной цепи и структурных особенностей RL2 методом ЯМР // 57-я международная научная студенческая конференция: материалы секции Физические методы в естественных науках, Новосибирск, 2019. 7. S.S. Ovcherenko, A.V. Shernyukov, O.A. Chinak, E.A. Sviridov, V.M. Golyshev, A.S. Fomin, I.A. Pyshnaya, E.V. Kuligina, V.A. Richter, E.G. Bagryanskaya, Structural and aggregation features of a human k-casein fragment with antitumor and cell-penetrating properties // ISMAR EUROMAR JOINT CONFERENCE 2019, Germany, 2019.

8. S.S. Ovcherenko, A.V. Shernyukov, O.A. Chinak, E.A. Sviridov, V.M. Golyshev, A.S. Fomin, I.A. Pyshnaya, E.V. Kuligina, V.A. Richter, E.G. Bagryanskaya, Structural and Aggregational Features of Intrinsically Disordered Peptide RL2 -Human Milk K-Casein Fragment with Antitumor and Cell Penetrating Properties // International Conference "Magnetic Resonance - Current State and Future Perspectives", Kazan, 2019.

9. С.С. Овчеренко, Проникновение неупорядоченного белка в клетки человека: мониторинг в реальном времени по ЭПР. // 58-я международная научная студенческая конференция: материалы подсекции "Химическая и биологическая физика", Новосибирск, 2020.

10. E. G. Bagryanskaya, S. S. Ovcherenko, O. A. Chinak, O. A. Krumkacheva, S. A. Dobrynin, V. M. Tormyshev, I. A. Kirilyuk «EPR Study of Intrinsically Disordered Proteins in Cell» International conference and workshop "Modern development of magnetic resonance 2020", Kazan, September 28-Ooctober 2, 2020.

11. С.С. Овчеренко, О.А. Чинак, А.В. Чечушков, С.А. Добрынин, И.А. Кирилюк, О.А. Крумкачева, В.А. Рихтер, Е.Г. Багрянская, Механизм проникновения неупорядоченного белка RL2: мониторинг по ЭПР и по конфокальной микроскопии XXXIII Симпозиум «Современная химическая физика», Туапсе, 2021.

12. E. Bagryanskaya, S. Ovcherenko, O. Chinak, O. Krumkacheva, S. Dobrynin, I. Kirilyuk Gentle Delivery of Stable Nitroxide Into Cells: Real Time Monitoring by EPR ISMAR2021 (on-line), (г. Токио, Япония, 2021).

13. S. Ovcherenko, O. Chinak, A. Chechushkov, S. Dobrynin, I. Kirilyuk, O. Krumkacheva, V. Richter, E. Bagryanskaya, Uptake of RL2 by Human lung cancer cells: monitoring by EPR and confocal microscopy Euromar2021 (on-line), (г. Любляна, Словения, 2021).

14. S.S. Ovcherenko, A.V. Shernyukov, D.M. Nasonov, A.V. Endutkin, D.O. Zharkov, E.G. Bagryanskaya, Kinetics of Base Pair Opening-Closing Process in DNA Duplex Containing OxoG:C Pair and OxoG:A Mismatch. 2022 International Voevodsky Conference. Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes, Novosibirsk, 2022.

15. D. Nasonov, S. Ovcherenko, A. Shernyukov, A. Endutkin, D. Zharkov, E. Bagryanskaya, Base-pair opening and closing kinetics in DNA duplex con-

taining oxoG:A mismatch. MODERN DEVELOPMENT OF MAGNETIC RESONANCE 2022, Kazan, 2022.

16. Д. Насонов, С. Овчеренко, А. Шернюков, А. Ендуткин, Д. Жарков, Е. Багрянская, Влияние окислительного повреждения охоG на стабильность дуплексов ДНК. Современные проблемы органической химии СПОХ-2023, Новосибирск, 2023.

17. С.С. Овчеренко, Д.М. Насонов, А.В. Шернюков, А.В. Ендуткин, Д.О. Жарков, Е.Г. Багрянская, Динамика открытия пар оснований охоG:С и охоG:А по данным методики ЯМР переноса намагниченности с воды. Научная конференция молодых ученых по тематикам вирусологии, молекулярной биологии, биофизики, биотехнологии и биоинформатики (OpenBio-2023), р. п. Кольцово, 2023.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] **Crenshaw C. M.** Hidden in plain sight: subtle effects of the 8oxoguanine lesion on the structure, dynamics, and thermodynamics of a 15-base pair oligodeoxynucleotide duplex / Crenshaw C. M., Wade J. E., Arthanari H. et al. // *Biochemistry*. -2011. - Oct 4. - Vol. 50, No 39. - P. 8463.

[2] **Every A. E.** Opening dynamics of 8-oxoguanine in DNA / Every A. E., Russu I. M. // *Journal of Molecular Recognition*. -2013. -2013.04. -Vol. 26, No 4. - P. 175.

[3] **Semenov D. V.** Recombinant Analogs of a Novel Milk Pro-Apoptotic Peptide, Lactaptin, and Their Effect on Cultured Human Cells / Semenov D. V., Fomin A. S., Kuligina E. V. et al. // *The Protein Journal*. – 2010. – 2010/04/01. – Vol. 29, \mathbb{N} 3. – P. 174.

[4] **Paletta J. T.** Synthesis and Reduction Kinetics of Sterically Shielded Pyrrolidine Nitroxides / Paletta J. T., Pink M., Foley B. et al. // *Organic Letters*. – 2012. – 2012/10/19. – Vol. 14, № 20. – P. 5322.

[5] **Eigen M.** Proton transfer, acid-base catalysis, and enzymatic hydrolysis. Part I: Elementary processes / Eigen M. // Angewandte Chemie International Edition. -1964. -1964-01. - Vol. 3, No 1. - P. 1.

[6] Várnai P. Opening Mechanism of G·T/U Pairs in DNA and RNA Duplexes: A Combined Study of Imino Proton Exchange and Molecular Dynamics Simulation / Várnai P., Canalia M., Leroy J.-L. // Journal of the American Chemical Society. – 2004. – 2004/11/01. – Vol. 126, № 44. – P. 14659.

[7] **Hwang T.-L.** Application of Phase-Modulated CLEAN chemical EXchange spectroscopy (CLEANEX-PM) to detect water–protein proton exchange and intermolecular NOEs / Hwang T.-L., Mori S., Shaka A. J. et al. //

Journal of the American Chemical Society. – 1997. – 1997-07-02. – Vol. 119, № 26. – P. 6203.